

## ペプチドC末端アミド化反応に必須な2つの酵素のウマ血清からの精製とcDNAクローニング

著者	飯田 年以
号	2708
発行年	1994
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21140">http://hdl.handle.net/10097/21140</a>

氏 名（本籍）	飯 田 年 以
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 第 2708 号
学位授与年月日	平成 6 年 9 月 7 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭和 61 年 3 月 25 日 北海道大学大学院農学研究科農芸化学 専攻修了
学 位 論 文 題 目	Purification and cDNA Cloning of the Two Equine Enzymes Essential for the Peptidyl- $\alpha$ - amidating Reaction, Peptidylglycine Monooxygenase and Peptidylamidoglycolate Lyase. (ペプチドC末端アミド化反応に必須な 2 つの酵 素のウマ血清からの精製と cDNA クローニング)
	(主 査)
論 文 審 査 委 員	教授 岡 本 宏 教授 林 典 夫  教授 柴 原 茂 樹

## 論文内容要旨

血管作用性ペプチド (VIP), ガストリン, カルシトニンなど多くの生理活性ペプチドは, カルボキシル末端 (C 末端) がアミド化されており, この構造がほとんどの場合生理活性の発現に必須である。このペプチド C 末端アミド化に関与する酵素活性が 1982 年にブタ下垂体より報告されて以来, ペプチド C 末端アミド化反応は一つの酵素によって触媒されると考えられてきた。最近著者らはウマ血清中に高い本酵素活性を見だし, その部分精製酵素を用いて反応生成物を解析し, アミド化反応が C 末端水酸化グリシン体を中間体とする 2 段階反応で進行することを明らかにした。また, その各々の反応は単一の mRNA にコードされる二つの異なる酵素 (ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ [PGM] およびペプチジルアミドグリコレートリアーゼ [PGL]) により触媒されることを推定した。

本研究で著者は, ウマ血清より C 末端アミド化反応を触媒する二つの酵素を同時にそれぞれ精製し, 両酵素の性質と基質特異性を初めて明らかにするとともに, 両酵素間の相互作用の有無を検討した。また両酵素をコードするウマ cDNA をクローニングし, 前駆体蛋白質の構造を明らかにするとともに両酵素の基質結合部位の類似性に関して考察を行った。

- (1) ウマ血清より基質親和性クロマトグラフィー, セファクリル S-200 ゲル濾過によって, 二つの酵素をそれぞれ 10,000 倍以上の比活性に精製した。
- (2) 両酵素の性質を調べた結果, PGM は分子量 25KDa, 至適 pH は 6.0 で cofactor として銅イオン, アスコルビン酸, 酸素を必要とした。一方, PGL は分子量 42KDa, 至適 pH は 5.5 で活性発現に cofactor を必要としなかった。また, 共に EDTA などの金属キレート剤によって阻害を受け, PGL でも金属が活性発現に関与していることが示唆された。PMSF など他の阻害剤は影響を与えなかった。また両酵素はお互いの基質に対しては反応性を示さなかった。
- (3) 両酵素間の相互作用に関して, 反応速度による解析を行った。PGM では C 末端グリシン体, PGL では C 末端水酸化グリシン体のみを基質として反応速度定数を算出した後, C 末端グリシン体のみを基質とした二つの酵素の混合系で反応を行い, グリシン体, 水酸化グリシン体, アミド体それぞれの濃度を経時で測定した。その結果, この二段階の酵素反応は逆反応を無視した逐次反応に近似でき, 両酵素間には反応速度における相互作用は存在しないことが示された。
- (4) 両酵素の基質特異性を, アミド化されるアミノ酸を種々置換したジペプチドを用いて反応速度パラメーター ( $K_m$  値及び  $k_{cat}$  値) を測定することにより検討した。その結果, 基質として用いた 16 種類のうち両酵素とも Asp を除く 15 種類でそれぞれ反応が進行した。そして, 共に Trp, Phe などの疎水性アミノ酸を持つ基質に対し高い親和性を示す一方, Glu, Lys などの親

水性アミノ酸や Gly, Ala などの側鎖の小さなアミノ酸を持つ基質に対しては親和性は低く、この傾向は両酵素で共通しており有意な相関が認められた。

- (5) ウマの種々の組織から調製した RNA を用いたノザンプロット解析の結果、両酵素をコードする mRNA は心房に高い発現が見られた。そこで心房より cDNA ライブラリーを作製してクローニングを行い、3' 側のスプライシングによって生じたと考えられる 3 種類の cDNA を得た。最長の cDNA がコードする前駆体蛋白質は 1020 アミノ酸残基からなっており、N 末端にシグナルペプチドが、C 末端側に膜貫通領域が存在した。一つの cDNA は膜貫通領域をコードする部分を欠いており、最初から分泌型の酵素をコードしていると考えられた。また、前駆体蛋白質の中央部と C 末端側には塩基性アミノ酸対から成るプロセシング想定部位が存在し、これらの部位で切断されて、N 末端側から PGM が、C 末端側から PGL が生成し、分泌されと考えられた。
- (6) PGM のアミノ酸配列中には His クラスターが存在し、活性部位と考えられた。ホモロジー検索の結果、この配列周辺の領域と相同性のある配列が PGL 中に存在していることが明らかとなった。これらの領域が基質結合部位を構成し、かつ類似した構造を有することによって、両酵素の基質に対する共通の親和性が示されるのではないかと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

血管作用性ペプチド (VIP), ガストリン, カルシトニンなど多くの生理活性ペプチドは, C 末端がアミド化されており, この構造は生理活性の発現に必須である。最近までペプチド C 末端アミド化反応は一つの酵素によって触媒されると考えられてきたが, 著者らはこれまでにアミド化反応が C 末端水酸化グリシン体を中間体とする 2 段階反応で進行すること, また, その各々の反応は単一の mRNA にコードされる二つの異なる酵素 (ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ [PGM] およびペプチジルアミドグリコレートリアーゼ [PGL]) により触媒されることを明らかにしてきた。

本研究で著者は, ウマ血清より C 末端アミド化反応を触媒する二つの酵素をそれぞれ精製し, 以下のように両酵素の性質と基質特異性を初めて明らかにするとともに両酵素間の相互作用の有無を検討した。さらに, 両酵素をコードするウマ cDNA をクローニングし, 前駆体蛋白質の構造を明らかにするとともに両酵素の基質結合部位の類似性に関して考察を行った。

- (1) ウマ血清より二つの酵素をそれぞれ 10,000 倍以上の比活性に精製した。
- (2) PGM は分子量 25kDa, 至適 pH は 6.0 で cofactor として銅イオン, アスコルビン酸, 酸素を必要とした。一方, PGL は分子量 42kDa, 至適 pH は 5.5 で活性発現には特に cofactor を必要としなかったが, EDTA などの金属キレート剤によって阻害を受けたことから金属が活性発現に関与していることが示唆された。
- (3) 両酵素間の相互作用に関して反応速度による解析を行った結果, この二段階の酵素反応は逆反応が無い逐次反応に近似でき, 両酵素間には相互作用は存在しないことが示された。
- (4) 両酵素の基質特異性に関して, 両酵素ともアミド化されるアミノ酸が疎水性である基質に対し高い親和性を示す一方, これが親水性アミノ酸や側鎖の小さなアミノ酸の基質に対しては親和性が低く, この傾向には両酵素間で有意な相関が認められることを示した。
- (5) ウマ心房 cDNA ライブラリーより, PGM と PGL をコードすると考えられる 3 種類の cDNA を得, うち 1 種類は膜貫通領域を欠く cDNA であった。これらの構造の解析から, PGM の活性部位と考えられる His クラスター配列周辺の領域と相同性のある配列が PGL 中に存在していることを明らかにし, これが両酵素の基質に対する共通の親和性の原因であることを示した。

以上のように, 本研究で著者はこれまでの研究をさらに発展させ, ペプチド C 末端アミド化に必須な二つの酵素の性質, 基質特異性および両酵素間の相互作用の有無を初めて明らかにするとともに両酵素の基質結合部位の類似性に関して考察を行い, ペプチド C 末端アミド化の反応機構の理解に新しい知見を与えた。従って, 本論文は学位論文に値するのみならず学術的価値の極めて高い研究である。